



TITLE:

精巣腫瘍におけるProliferating Cell Nuclear Antigen(PCNA)および核小体形成体関連蛋白(AgNOR)の発現について

AUTHOR(S):

栗栖, 弘明; 島袋, 智之; 和田, 尚; 山本, 光孝;
Shameem, Isteq A.; 大塚, 知明; 坂野, 滋; ... 山本, 憲
男; 越戸, 克和; 上領, 頼啓

CITATION:

栗栖, 弘明 ...[et al]. 精巣腫瘍におけるProliferating Cell Nuclear Antigen(PCNA)および核小体形成体関連蛋白(AgNOR)の発現について. 泌尿器科紀要 1993, 39(8): 715-720

ISSUE DATE:

1993-08

URL:

<http://hdl.handle.net/2433/117910>

RIGHT:

精巣腫瘍における Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) および核小体形成体関連蛋白 (AgNOR) の発現について

山口大学医学部泌尿器科学教室 (主任: 内藤克輔教授)

栗栖 弘明, 島袋 智之, 和田 尚

山本 光孝, Isteaq A. Shameem, 大塚 知明

坂野 滋, 松山 豪泰, 内藤 克輔

光市立病院泌尿器科 (部長: 山本憲男)

山 本 憲 男

山口労災病院泌尿器科 (部長: 越戸克和)

越 戸 克 和

済生会下関病院泌尿器科 (部長: 上領頼啓)

上 領 頼 啓

ANALYSIS OF PROLIFERATING CELL NUCLEAR ANTIGEN AND NUCLEOLAR ORGANIZER REGION IN TESTICULAR TUMORS

Hiroaki Kurisu, Tomoyuki Shimabukuro, Takashi Wada,
Mitsutaka Yamamoto, Isteaq A. Shameem, Tomoaki Otsuka,
Shigeru Sakano, Hideyasu Matsuyama and Katsusuke Naito

From the Department of Urology, Yamaguchi University School of Medicine

Norio Yamamoto

From the Department of Urology, Hikari City Hospital

Yoshikazu Koshido

From the Department of Urology, Yamaguchi Rosai Hospital

Yoriaki Kamiryo

From the Department of Urology, Saiseikai Shimonoseki Hospital

Immunohistochemical staining using the monoclonal antibody of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and argyrophilic nucleolar organizer region associated protein (AgNOR) staining were performed on 28 paraffin-embedded testicular tumors, and their correlation was assessed according to histological type, clinical staging and tumor markers. PCNA positive rates and AgNOR numbers in nuclei were 57.9%, 4.38 in seminomas, 63.4%, 5.79 in embryonal carcinomas, 37.7%, 2.63 in teratomas, 61.3%, 4.43 in yolk sac tumors, 79.5%, 7.12 in choriocarcinomas, and 20.9%, 3.03 in cells of the normal seminiferous tubule, respectively. In pure seminomas, the PCNA positive rates and AgNOR numbers of the stage II to III group (72.6%, 4.75) were higher than those of the stage I group (47.8%, 3.67), but there was no significant difference between the two groups. There was a significant correlation between PCNA positive rate and AgNOR number in all specimens ($r=0.76$, $p<0.002$). These findings indicate that PCNA and AgNOR are suitable indicators for proliferative activity of testicular tumors.

(Acta Urol. Jpn. 39: 715-720, 1993)

Key words: Testicular tumor, PCNA, AgNOR

緒 言

proliferating cell nuclear antigen (PCNA) は、G1 後期から S 期にかけて合成される DNA polymerase- δ の補助蛋白質で、DNA 合成能との密接な関係が報告されている¹⁾。近年、腫瘍の悪性度や予後の判定に用いられるようになり、当教室でも腎細胞癌および膀胱癌のパラフィンブロックを用いて悪性度および予後との関連性について検討し^{2,3)}、さらにパラフィンブロックの長期保存例においても PCNA の発現率には変化はないことが確認されている²⁾。

また核小体に認められるところの銀染色により染色される核小体形成関連タンパク (argyrophilic nucleolar organizer region associated protein: AgNOR) も同様に細胞増殖能を反映することが知られている⁴⁾。

今回、精巣腫瘍パラフィンブロックを用いて PCNA 染色および AgNOR 染色を行い、両法でえられたパラメーターが精巣腫瘍細胞増殖能の指標となりうるかどうか、また両パラメーターの相関性、組織型別両パラメーターの発現様式等を検討したので報告する。

対 象 と 方 法

1978年1月から1990年12月までに山口大学医学部泌尿器科学教室および関連病院にて、高位精巣摘除術を施行した28症例を検討対象とした。年齢は1歳から55歳で、平均28.9歳であった。臨床的事項および病理組織学的事項は精巣腫瘍取り扱い規約⁵⁾によった。組織型の内訳は、seminoma 14例、teratoma 3例、yolk sac tumor 2例、複合組織型9例であった (Table 1)。ホルマリン固定パラフィン包埋ブロックとして保存されていた精巣組織を、3 μ m および 5 μ m に薄

切し、3 μ m 切片を AgNOR 染色に、5 μ m 切片を HE 染色および PCNA 染色に供した。

PCNA 染色は、すでに報告した avidin-biotin peroxidase complex (ABC) 法を若干修飾して用いた⁶⁾。すなわちキシレン、アルコール列にて型通り脱パラフィンし、水洗後、0.3% H₂O₂ 水溶液にて内因性ペルオキシダーゼ活性を阻害した。50倍に希釈した抗 PCNA 抗体 (DAKO 社) を組織切片に加え、湿室内室温にて1時間反応させた後、冷 PBS で洗浄した (0°C, 5分間×3回)。ついで、ビオチン化二次抗体 (Vector Lab.) と1時間、調整済みの ABC complex (Vector Lab.) と30分間、いずれも湿室内室温にて反応させた。ペルオキシダーゼ発色には 3,3'-DAB・H₂O₂ 液を用い、増感のためイミダゾール (0.01 M, 和光純薬) を添加した。また、核染色にはマイヤーのヘマトキシリンを使用した。判定には光学顕微鏡を用い、倍率400倍にて異なる数視野の1,000個以上の腫瘍細胞を観察し、陽性率を算出した。複合組織型の場合は、各組織型ごとに陽性率を求めた。

AgNOR 法は Ploton ら⁴⁾の one-step silver colloid method に準じて行った。すなわち、ゼラチンを1%蟻酸水に2%となるよう溶解し、50%硝酸銀溶液と1:2で暗室にて混合して染色液を作製し、30分間室温で反応させ、アルコール、キシレンにて脱水透徹後、封入した。判定は各組織型ごとに倍率1,000倍にて行い、腫瘍細胞100個の核内の AgNOR 発現を検討し平均 AgNOR 数を算出した。統計学的検定には Student's t-test, Wilcoxon test を用いた。

結 果

I. PCNA 染色像と AgNOR 染色像

Fig. 1 に典型的な PCNA (Fig. 1A) および AgNOR (Fig. 1B) 染色像を示した。両染色法とも全例において評価可能であった。PCNA 陽性細胞は、ほぼ全例において被膜側の方が中心部より多く認められた。

II. 組織型別 PCNA 陽性率と AgNOR 数

Table 2 に各組織型での PCNA 陽性率および AgNOR 数を示した。seminoma での検討は、単一組織型の typical seminoma 13例、anaplastic seminoma 1例と複合組織型で seminoma を含む5例の計19例で行い、平均 PCNA 陽性率および AgNOR 数はそれぞれ $57.9 \pm 19.6\%$ 、 4.38 ± 1.47 (mean \pm SD) であった。anaplastic seminoma は1例のみであったが、PCNA 陽性率、AgNOR 数はそれぞれ

Table 1. Histopathological types of cases

A. One histological type	19
Seminoma	14
typical	13
anaplastic	1
Teratoma	3
mature	2
immature	1
Yolk sac tumor	2
B. More than one histological type	9
Embryonal ca. + other types	6
Choriocarcinoma + other types	2
Other combinations	1

60.2%, 4.70であった。

embryonal carcinoma は6例とも全例複合組織型症例に認められたが, 平均 PCNA 陽性率および AgNOR 数は $63.4 \pm 21.6\%$, 5.79 ± 2.10 であった。また, HE 染色像にて正常と判定された精細管の PCNA 陽性率および AgNOR 数は $20.9\% \pm 9.23$, 3.03 ± 0.50 であり ($n=3$), seminoma および em-

bryonal carcinoma は正常精細管に比べ高値を示し, PCNA 陽性率では統計学的に有意差が認められた ($p<0.05$)。

teratoma では3例は単一組織型であったが, 4例は複合組織型に認められた。そのうち mature 6例, immature 1例でのおおの平均 PCNA 陽性率および AgNOR 数は $37.7 \pm 21.2\%$, 2.63 ± 1.09 と 37.5% , 3.32 であり正常精細管との間に有意差は認められなかったが, mature teratoma の AgNOR 数は seminoma および embryonal carcinoma に比較して統計学的に有意に低値であった ($p<0.05$)。

yolk sac tumor と choriocarcinoma は PCNA 陽性率, AgNOR 数ともに正常精細管に比し高値であったが, 症例数が少ないため統計学的検定はできなかった。

Ⅲ. seminoma における PCNA 陽性率と AgNOR 数

pure seminoma 14例について stage 別での PCNA 陽性率を Table 3 に示した。stage I での PCNA 陽性率は $47.8 \pm 14.3\%$, stage II, III では $72.6 \pm 14.2\%$ と stage が進むにつれ高値を示す傾向が認められた。AgNOR 数でも同様の結果であった。

Ⅳ. PCNA 陽性率と AgNOR 数との相関性

全組織型における PCNA 陽性率と AgNOR 数の間には有意の相関関係 ($r=0.76$) が認められた (Fig. 2)。

Ⅴ. 精巣腫瘍マーカーと PCNA 陽性率および AgNOR 数との関係

術前 hCG- β 高値を示した2例の PCNA 陽性率および AgNOR 数は $43.9 \pm 4.4\%$, 3.89 ± 0.48 , また LDH 高値を示した2例のそれらは $56.4 \pm 0.8\%$, 4.49 ± 0.25 で, マーカー正常群の $51.8 \pm 18.6\%$, 3.81 ± 1.06 と比べて有意差を認めなかった。

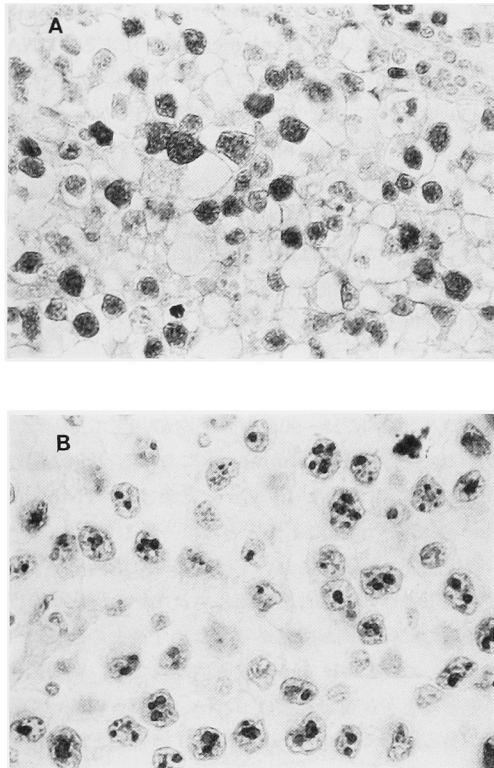


Fig. 1. PCNA staining (A) and AgNOR staining (B) of stage IIA seminoma. PCNA positive rate and AgNOR number were 87%, 4.64, respectively.

Table 2. PCNA positive rates and AgNOR numbers in each pathological type.
im.: immature

Histological type	No. of case	PCNA (%) Mean \pm SD	AgNOR (No.) Mean \pm SD
Seminoma	19	57.9 ± 19.6	4.38 ± 1.47
Embryonal ca.	6	63.4 ± 21.6	5.79 ± 2.10
Teratoma	6	37.7 ± 21.2	2.63 ± 1.09
Yolk sac tumor	3	61.3 ± 20.0	4.43 ± 0.60
im. Teratoma	1	37.5	3.32
Choriocarcinoma	1	79.5	7.12
Normal	3	20.9 ± 9.23	3.03 ± 0.50

Table 3. PCNA positive rates and AgNOR numbers versus clinical stage in seminomas

Stage	No. of case	PCNA (%) (Mean \pm SD)	AgNOR (No.) (Mean \pm SD)
I	11	47.8 \pm 14.3*	3.67 \pm 0.93**
II-IIIc	3	72.6 \pm 1.42*	4.75 \pm 0.26**

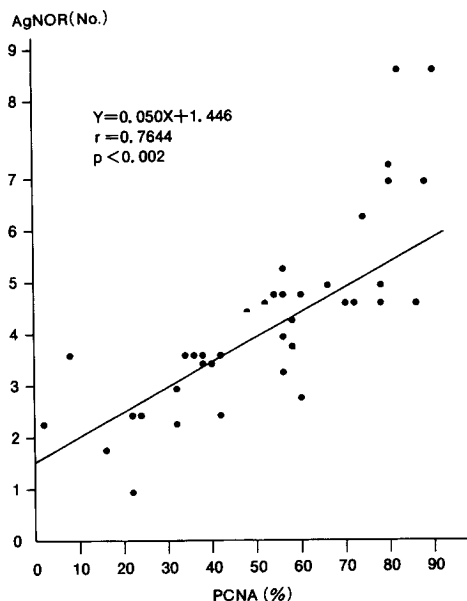
* $p=0.1$ ** $0.2 < p < 0.4$ 

Fig. 2. Correlation between PCNA positive rates and AgNOR numbers

考 察

精巣腫瘍では、他の泌尿器悪性腫瘍と異なり細胞異型や組織異型で悪性度が判定されず、seminomaにおいては核分裂像によりその増殖能を判断しているのが現状である。したがって、精巣腫瘍における増殖能をより客観的に示すことは、腫瘍細胞の特性を知るためにも重要である。当教室では以前、flow cytometry (FCM) を用いて精巣腫瘍のパラフィン包埋組織での DNA ploidy について報告したが⁷⁾、解析可能であった症例は全体の56%であり、解析不能例の多さに問題を残した。その反省に立って今回われわれは、PCNA染色と AgNOR 染色を導入し、精巣腫瘍細胞増殖能の判定を試み、全例において検討可能であった。

現在まで細胞増殖能の測定のために PCNA や Ki-67¹⁰⁾ など核内増殖関連蛋白を測定する方法、³H-thymidine¹¹⁾ や BrdU²⁴⁾ を用いる標識法、FCM を用いた DNA ploidy 測定法¹⁰⁾などがあるが、PCNA

はホルマリン固定されたパラフィン標本から検出できるため、すでに予後のわかっている多数の症例を用いて予後との関連性を解析できるという利点を持つ。

DNA ploidy もホルマリン固定パラフィン標本からの検出が試みられている²⁵⁾が、染色手技が煩雑なこと、明瞭なヒストグラムをえることが困難であり、結果の信頼性に欠けることなど問題点も多い。また、核小体形成体の関連蛋白である AgNOR は C23 蛋白、B23 蛋白、RNA polymerase I などのリン酸化蛋白で、その増加は RNA polymerase I による rDNA 転写活性の指標と考えられており、増殖能を反映することが知られている^{8,9)}。この方法も PCNA と同様にパラフィン標本から検出できるという利点を持つ。

以上述べたように今回検討した2つの方法はパラフィン標本から検出でき、検討した全症例において評価可能であり、さらには複合組織型においても各組織型の増殖能を個別に推測できる可能性をもち、精巣腫瘍の特性解析上有用なものの1つとなりうると考えられる。

今回の検討結果から seminoma においては、PCNA 陽性率は15~90.5%、平均57.9%であった。これは、報告される seminoma における Ki-67 陽性率¹⁰⁾および in vivo, in vitro における ³H-thymidine 法で求めた標識率^{11,12)}とほぼ一致していた。

腎細胞癌、膀胱癌においては PCNA 陽性率が予後推定因子となりうることが報告されている^{2,3,13)}。今回の検討では死亡例が少なかったため予後との比較はできなかった (Table 4, 5)。文献的にみても、精巣腫瘍の増殖能と予後との比較は DNA ploidy について報告があるが、Zimmerman¹⁰⁾ は、ほとんどが早期癌

Table 4. Outcome of 14 cases in pure seminomas

No.	Age	Stage	PCNA (%)	AgNOR (No.)	Outcome
1	50	I	36.8	3.60	Alive
2	31	I	48.3	4.36	Alive
3	38	I	69.7	4.64	Alive
4	32	III B	77.6	4.49	Alive
5	36	I	41.9	3.56	Alive
6	34	I	59.6	2.88	Alive
7	23	III C	53.1	5.12	Alive
8	30	I	39.5	3.41	Alive
9	55	I	42.4	2.38	Alive
10	26	I	55.6	4.74	Alive
11	29	I	57.1	4.24	Alive
12	32	II A	87.0	4.64	Alive
13	44	I	60.2	4.70	Alive
14	29	I	15.0	1.91	Alive

Table 5. Outcome of 14 cases in non-seminomatous tumors.
 T: teratoma, E: embryonal carcinoma, S: seminoma
 Y: yolk sac tumor, C: choriocarcinoma, im: immature
 *: too small number of cells to evaluate

No.	Age	Stage	Histological type	PCNA (%)	AgNOR (No.)	Outcome
1	1	I	T	1.7	2.25	Alive
2	26	I	E	82.7	8.60	Alive
			S	37.0	3.62	
3	38	III C	S	79.2	7.04	Alive
			E	*	*	
4	1	I	Y	71.3	4.62	Alive
5	21	III C	E	74.9	6.14	Died
			T	57.6	3.72	
			S	83.4	4.38	
6	30	I	S	90.5	8.59	Alive
			E	*	*	
7	22	I	T	32.0	2.21	Alive
8	1	I	Y	33.3	3.62	Alive
9	25	I	imT	37.5	3.32	Alive
10	33	I	E	87.8	7.00	Alive
			T	56.7	3.98	
			C	*	*	
11	27	I	E	55.0	4.88	Alive
			C	79.5	7.12	
12	30	III B	E	23.6	2.35	Died
			T	21.4	1.01	
13	21	I	E	56.1	5.79	Alive
			T	56.8	2.63	
			S	*	*	
14	31	III B	S	66.7	4.94	Alive
			Y	79.2	5.04	

症例であったため, また Quirke ら²⁰⁾ は化学療法の有効率が高いことを理由に生存率との比較を行っておらず, Slide ら²¹⁾ は diploid 群では7例中6例(85.7%)が, aneuploid 群では38例中21例(55.3%)が2年以上生存と aneuploid 群での生存率が低くなっていたが, 統計学的に有意差はなかったと述べている。

精巣腫瘍は他の悪性腫瘍に比べ化学療法や放射線療法によく反応し, また増殖している細胞ほどこれらの治療法に感受性が高い^{22,23)}ことを考えると, 増殖能が高いほど, すなわち PCNA 陽性率が高いあるいは AgNOR 数が多いほど種々の化学療法や放射線療法に高い感受性を示し, 良好な治療成績がえられることになる。事実, 今回の検討結果で増殖能が低かった teratoma は化学療法にも抵抗性であるという報告も多い^{26,27)}。今後症例数を重ね, 精巣腫瘍における PCNA 陽性率および AgNOR 数とその転移, 再発, 予後とともに, 化学療法に対する感受性などのよ

うな関係があるかを検討していきたい。

結 語

PCNA および AgNOR は精巣胚細胞腫瘍の増殖能を反映し, またパラフィン標本を用いて検討できる点より複合組織型においても各組織型の増殖能を個別に推測できる可能性をもっている。さらには増殖能と化学療法に対する感受性をも検討できる可能性をもち, 精巣腫瘍の特性解析上有用な指標のひとつになりうると考えられた。

本論文の要旨は 第30回日本癌治療学会総会にて発表した。(本研究の一部は 文部省科学研究費, 一般研究 (C), No. 02670709 によって行われた。)

文 献

- 1) Prelich G, Tan C, Kostura M, et al.: Functional identity of proliferating cell nuclear antigen and a DNA polymerase- δ auxiliary

- protein. *Nature* **326**: 517-520, 1987
- 2) 和田 尚, 島袋智之, 栗栖弘明, ほか: Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) の表在性膀胱癌組織における発現—パラフィン切片での応用—. *泌尿紀要* **39**: 313-319, 1993
 - 3) 島袋智之, 和田 尚, 栗栖弘明, ほか: 細胞増殖関連核抗原 Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) の腎細胞癌組織における発現様式. *Cytometry Research* **3**: 10-15, 1993
 - 4) Ploton D, Mennager M, Jeannesson P, et al.: Improvement in the staining and visualization of the argyrophilic proteins of the nucleolar organizer region at optimal level. *Histochem J* **18**: 5-14, 1986
 - 5) 日本泌尿器科学会, 他編 睾丸腫瘍取り扱い規約. 84-85, 金原出版, 東京, 1984
 - 6) 島袋智之, 和田 尚, 升田千代子, ほか: 抗 PCNA 抗体を用いた増殖細胞検出法の基礎的検討. *Cytometry Research* **2**: 18-23, 1992
 - 7) 吉弘 悟, 山本光孝, 島袋智之, ほか: Flow Cytometry を用いた精巣腫瘍パラフィンブロックによる Ploidy の検討. *泌尿紀要* **37**: 601-605, 1991
 - 8) Buys CHCH and Osinga J: Selective staining of the same set of nucleolar phosphoproteins by silver and Giemsa A combined biochemical and cytochemical study on staining of NORs. *Chromosoma* **89**: 387-396, 1984
 - 9) Dimova RN, Markov DV, Gajdardjieva KC, et al.: Electron microscopic localization of silver staining NOR-proteins in rat liver nucleoli upon D galactosamine block of transcription. *Eur J Cell Biol* **28**: 272-277, 1982
 - 10) Dui W, Dieckmann KP, Loy V, et al.: Immunohistochemical determination of proliferative activity in seminomas. *J Clin Pathol* **41**: 304-307, 1988
 - 11) Rabes HM: Proliferation of human testicular tumors. *Int J Androl* **10**: 127-137, 1987
 - 12) Silvertrini R, Costa A, Pilotti S, et al.: Cell kinetics in human germ cell tumors of the testis. In: *Testicular cancer and other tumors of the genitourinary tract*. Edited by Pavone-Macaluso N, Smith PH, Bagshar MA, pp. 55-62, Plenum Press, New York, 1985
 - 13) Lipponen PK and Eskelinen MJ: Cell proliferation of transitional cell bladder tumors determined by PCNA/cyclin immunostaining and its prognostic value. *Br J Cancer* **66**: 171-176, 1992
 - 14) Hall PA, Crocker J, Watts A, et al.: A comparison of nucleolar organizer region staining and Ki67 immunostaining in non-Hodgkin's lymphoma. *Histopathology* **12**: 373-381, 1988
 - 15) Tanaka T, Takeuti T, Nishikawa A, et al.: Nucleolar organizer regions in hepatocarcinogenesis induced by N-2-fluorenylacetamide in rats. Comparison with immunohistochemistry using a monoclonal antibody against bromodeoxyuridine. *Jpn J Cancer Res* **80**: 1047-1051, 1989
 - 16) Crocker J, Macartney JC and Smith PJ: Correlation between DNA flowcytometric and nucleolar organizer region data in non-Hodgkin's lymphoma. *J Pathol* **154**: 151-156, 1988
 - 17) Landberg G, Tan EM and Roos G: Flow cytometric multiparameter analysis of proliferating cell nuclear antigen/cyclin and Ki67 antigen. A new view of the cell cycle. *Exp Cell Res* **187**: 111-118, 1990
 - 18) Battersby S and Anderson TJ: Correlation of proliferative activity in breast tissue using PCNA/cyclin. *Hum Pathol* **21**: 781, 1990
 - 19) Zimmerman A: Aneuploid in malignant tumors of the testis and their lymphatic metastasis. *Urology A* **19**: 391-396, 1980
 - 20) Quirke P, Dyson JED, Sutton J, et al.: Assessment of the germ cell tumors of testis by flow cytometry and histopathology. *Adv Biosci* **55**: 45-54, 1986
 - 21) Sledge GW Jr, Eble JN, Roth BJ, et al.: Relation of proliferative activity to survival in patients with advanced germ cell cancer. *Cancer Res* **48**: 3864-3868, 1988
 - 22) Valeriote F and van Putten L: Proliferation-dependent cytotoxicity of anticancer agents. A review. *Cancer Res* **35**: 2619-2630, 1975
 - 23) Thomas GM: Controversies in the management. *Cancer* **55**: 2296-2302, 1985
 - 24) 島袋智之, 山本光孝, 三井 博, ほか: In vitro BrdU 標識法と抗 BrdU モノクローナル抗体を用いた尿路性器腫瘍の細胞動態学的研究. *泌尿紀要* **35**: 1285-1290, 1989
 - 25) Murphy WM, Chandler RW and Trafford RM: Flow cytometry of deparaffinized nuclei compared to histological grading for the pathological evaluation of transitional cell carcinomas. *J Urol* **135**: 694-697, 1986
 - 26) Wettlaufer JN, Feiner MA and Robinson WA: Vincristine, cisplatin, and bleomycin with surgery in the management of advanced metastatic nonseminomatous testis tumors. *Cancer* **53**: 203-209, 1984
 - 27) Donohue JP, Einhorn LH and Williams SD: Cytoreductive surgery for metastatic testis cancer: Considerations of timing and extent. *J Urol* **123**: 876-880, 1980

(Received on November 9, 1992)

(Accepted on April 17, 1993)